

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

挪威 國（地區） 申請專利，申請日期：1998.07.08. 案號：19983141，☐有 ☒無主張優先權

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明()

[發明背景]

本發明關於誘發 T 細胞所介導免疫反應之蛋白質或肽類，且關於用於抗-癌症治療之癌症疫苗及組合物，其包含此類蛋白質或肽類片段。本發明亦關於包含該等蛋白質或肽類之醫藥組合物，及用於產生能夠於哺乳動物中辨識且破壞腫瘤細胞之 T 淋巴細胞。

癌症係經由一種涉及突變發生之多步驟過程所發展成。此等突變導致屬於兩類基因之表現/功能改變：致癌基因與腫瘤抑制基因。致癌基因於天然中係自前-致癌基因，經由定點突變或易位而產生，藉此導致含有該突變之細胞處於經轉化之狀態。所有致癌基因皆編碼一種蛋白質且基尤其進行作用。前-致癌基因為細胞中之正常基因，其具有轉變成為致癌基因之潛力。於大多數個案中，已顯示前-致癌基因為訊號傳遞途徑之組成份。致癌基因以顯性之方式作用。另一方面，腫瘤抑制基因則以隱性之方式（亦即經由喪失功能）作用，並當編碼功能性蛋白質之兩對偶基因皆已改變，而製造出無功能性基因產物時，其即助長癌症發生。

經改變之致癌基因與腫瘤抑制基因組合之協同作用，導致細胞轉化作用並發展成惡性腫瘤表型。然而此等細胞容易衰老且具有有限的壽命。於大多數癌症中，腫瘤細胞之無限增殖性必需先開始產生一

五、發明說明(2)

種稱為端粒酶之酵素複合物。於體細胞中，此酵素之催化性次單位在正常情形下並不表現。額外之事件，例如由腫瘤病毒所表現蛋白質之作用或非活化啟動子位置之去甲基化作用，可能導致腫瘤細胞中功能性端粒酶複合物之表現。

於人類癌症免疫學之領域中，在過去二十年已著力於鑑定出真正的癌症特異性抗原。尤其，已專注於分析對抗人類腫瘤抗原之抗體。先前技藝暗示，此等抗體可用於診斷及治療目的，例如與抗-癌劑結合。然而，抗體僅能與暴露於腫瘤細胞表面上之腫瘤抗原結合。因為如此，欲產生以身體免疫系統為主之癌症治療法的努力並不如預期成功。

免疫系統之基礎特性在於，其可分辨自我與非自我，且正常下不會對自己的分子反應。已顯示來自其他個體之組織或器官植入物的排斥現象，係一種針對植入細胞表面上之外來抗原的免疫反應。一般，免疫反應包含體液性反應（由抗體所介導）及細胞性反應。抗體係由 B 淋巴細胞製造及分泌，且代表性地辨識呈天然構形之自由態抗原。因此彼等可能辨識幾乎任何暴露於抗原表面上之位點。相反地，T 細胞（其介導免疫反應之細胞性防禦）僅辨識與 MHC 分子有關之抗原，且僅於適當抗原加工後始能辨識。此抗原加工通常包含將蛋白質分解成片段之作用，產生符合 MHC 分子溝槽之肽類。

五、發明說明 (4)

釋在移植方面欲發現 HLA 吻合之器官供體的困難性。HLA 分子基因變異於免疫學上之顯著性，使其作為免疫-反應基因而顯現出。經由彼等與肽類結合之能力，有或無特定 HLA 分子存在，可掌控個體對特殊肽表位反應之能力。結果，HLA 分子決定對疾病之抗性或易罹患性。

T 細胞可藉由各種機制抑制癌症之發展及成長。細胞毒性 T 細胞（第 I 類 HLA 所限制之 CD8+ 與第 II 類 HLA 所限制之 CD4+）可直接殺死展現適當腫瘤抗原之腫瘤細胞。正常下，CD4+ 輔助 T 細胞為細胞毒性 CD8+ T 細胞反應所必需，但若肽類抗原經適當 APC 展現時，細胞毒性 CD8+ T 細胞可被直接活化，而造成較快速、較強且更有效之反應。

雖然由第 II 類 HLA 分子所展現之肽類具有不同長度（12-25 個胺基酸），由第 I 類 HLA 分子所展現之肽類正常下必須確實具有九個胺基酸殘基長，以適合置入第 I 類 HLA 結合凹槽中。較長之肽類若其於展現在第 I 類 HLA 結合凹槽中之前，無法於內部被 APC 或標靶細胞，例如癌細胞加工處理時，則會導致不結合。對此九個胺基酸之需求之差異僅有且非常少數已被報導，且於該等個案中，所展現肽類之長度為八或十個胺基酸殘基長。

MHC 如何與肽類結合之回顧，可見於漢斯-喬

五、發明說明(5)

格雷蒙西，湯馬斯福雷得與史提芬史凡諾維克（1995，免疫遺傳學，41，178-228）及於貝那加（1992，科學 257，880-881）。麥爾等人（1987，進階免疫學，J.B.里賓克特公司，費城）中提出更廣泛解釋本發明之技術背景。於吾等之國際專利申請案 PCT/N092/00032（公開號為 WO92/14756）中，吾等描述相對於其前-致癌基因或腫瘤抑制基因蛋白質，具有一定點突變或易位之致癌基因產物的合成肽類及片段。此等肽類相當於、完全涵蓋或為經加工處理，而由癌細胞或其他抗原展現細胞所展現之致癌基因蛋白片段或腫瘤抑制基因蛋白質的片段，且經展現為由每一個體中至少一等位基因所編碼之 HLA-肽類複合物。此等肽類亦經顯示可誘導針對由細胞經由加工所產生，且經展現於 HLA 分子中之確切致癌基因蛋白片段的特殊 T 細胞反應。尤其，吾等描述衍生自 p21-ras 蛋白質，其於特定胺基酸位置即位置 12、13 與 61 具有定點突變之肽類。此等肽類已顯示有效於活體外調節癌細胞之生長。而且，該等肽類經顯示可經由於接種疫苗或癌症治療程序中投藥此等肽類，而誘導對抗具有已突變 p21-ras 致癌基因蛋白質之癌症細胞的 CD4+ T 細胞免疫作用。稍後吾等已顯示，此等肽類亦可經由上述投藥，而誘導對抗具有已突變 p21 ras 致癌基因蛋白質之癌症細胞的 CD8+ T 細胞免疫作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (6)

。

然而，上述之肽類僅可用於特定數種癌症，亦即該等涉及於前-致癌基因或腫瘤抑制基因中，具有定點突變或易位之致癌基因者。因此強烈需要其可有效對抗更普遍範圍之癌症的抗癌治療或疫苗。

一般，關於腫瘤細胞中所發現之遺傳變異，腫瘤間差異非常大。此暗示癌症疫苗可能之治療功效與預防強度，將隨著該疫苗能夠誘導 T 細胞所對抗免疫反應之標靶數量而增加。多重標靶疫苗亦可藉由治療由最初腫瘤所產生之野化變異，而減低新型腫瘤形成的危險。

最近酵素端粒酶因其在預防細胞老化上所認定之作用，而成為受注意的焦點。端粒酶為一種 RNA-依賴型 DNA 聚合酶，其使用已存在做為端粒酶全酶次單位之 RNA 模板，合成端粒之 DNA 重複片段。由該酵素所合成之重複片段被併入端粒中，其為組成每一染色體之線形 DNA 末端處所發現的特殊 DNA-蛋白質結構。端粒酶最先於四膜蟲屬中鑑定得（葛萊得與布雷克本，1985，*細胞* 43，405-413）。最近已由麥爾森等人（1997，*細胞* 90，785-795）鑑定得人類端粒酶催化性次單位序列，彼等將其分別命名為基因 hEST2 及 hTERT。此外，亦已鑑定得三種與端粒酶活性相關連之其他蛋白質：四膜蟲之 p80 與 p95（柯林斯等人，1995，*細*

五、發明說明(7)

胞 81, 677-686) 及 TP1/TLP1, 其為四膜蟲 p80 之哺乳動物類似物 (哈林頓等人, 1997, 科學 275, 973-977; 中山等人, 1997, 細胞 88, 875-884)。

於大多數正常細胞中端粒酶並不被表現。人類中大部份體細胞譜系顯示無可偵測之端粒酶活性, 但是在種系及於某些幹細胞區室 (其為具活性細胞分裂之部位) 中偵測到端粒酶活性 (哈利等人, 1994, 冷泉港定量生物學研討會 59, 307-315; 金姆等人, 1994, 科學 266, 2011-2015; 布柯利等人, 1995, PNAS USA 92, 9082-9086; 康特等人, 1995, 血液 85, 2315-2320; 日山等人, 免疫學期刊 155, 3711-3715)。大多數人類體細胞之端粒會隨著該生物體年齡之增加而變短, 其與此等細胞中缺乏端粒酶活性一致。經培養之人類細胞亦顯示端粒會變短。端粒變短在經轉形之經培養人類細胞中持續發生, 直到端粒以變得相當短。於此點 (稱為危機點), 觀察到顯著程度之細胞死亡及核型不穩定性。

無限增殖細胞 (其具有於培養物中無限生長之能力) 以低頻率自危機族群中突起。此等無限增殖細胞具有高度之端粒酶活性及穩定的端粒。端粒酶活性亦可容易地於絕大多數至今所分析之人類腫瘤樣本中偵測到 (金姆等人, 1994, 科學 266,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(8)

2011-2015)，其包括卵巢癌（康特等人，1994，*PNAS USA* 91，2900-2904）。謝與貝其帝曾提出廣範圍之回顧（1997，*歐洲癌症期刊* 33，781-791）。因此，端粒酶之活性可克服因端粒長度而無法持續細胞分裂之屏障。克服正常終止機制之細胞可藉由穩定端粒長度而達成，可能是由於端粒酶之活性所致。

與人類癌症發展有關之病毒例如伊斯坦巴病毒（EBV，與B細胞惡性腫瘤及鼻咽癌有關）及人類乳頭瘤病毒（HPV，與腦癌有關）長期以來已知具有使人類細胞無限增殖之能力。現已經證明，誘導端粒酶活性維此過程之關鍵元件（克林胡茲等人，1996，*自然*，380，79-82）。

於是，端粒酶為用於癌症療法之可能標靶。因此已推測端粒酶抑制劑可做為新類抗-癌藥劑（回顧見於夏瑪等人，1997，*Ann Oncol* 8(11)，1063-1074；艾賽羅得，1996，*自然醫學* 2(2)，158-159；胡米尼奇，1996，*Acta Biochim Pol*，43(3)，531-538）。已暗示鑑定得人類端粒酶催化性次單位，可提供用於鑑定此類藥劑之生化試劑（麥爾森等人，1990，*細胞* 1197，785-795）。亦已暗示端粒酶為供診斷或前診癌症之標記物（索利亞雷瑟，1997，*癌症快報* 84(10)，963-970；達西等人，1997，*臨床化學* 43(5)，708-714）。

五、發明說明 (10)

根據本發明之第六層面，吾等提供一種用以製備如本發明第五層面中所提供之醫藥組合物的方法，該方法包含將至少一種如本發明第一層面中所提供之端粒酶蛋白質或肽類，與至少一種能夠誘導對抗致癌基因或突變型腫瘤抑制蛋白質或肽類之 T 細胞反應的肽類，以及醫藥上可接受之載體或稀釋劑混合。

根據本發明之第七層面，吾等提供端粒酶蛋白質或肽類或編碼端粒酶蛋白質或肽類之核酸用於製備供治療或預防癌症之醫藥品的用途。

根據本發明之第八層面，係提供一種製造能夠辨識及破壞哺乳動物腫瘤細胞之 T 淋巴的方法，其包含自哺乳動物採集 T 淋巴細胞樣本，並將該 T 淋巴細胞樣本於其量足以產生端粒酶蛋白質或肽類特異性 T 淋巴之端粒酶蛋白質或肽類存在下進行培養。

本發明更特別地以所附之圖式（僅供例舉說明）加以敘述，其中：

圖 1 列示人類端粒酶催化性次單位之序列及固有之胺基酸基序，如麥爾森等人（1997，細胞 90，785-795）及中村等人（1997，科學 277，955-959）所鑑定得。列示出基序 T、1、2、3（中村之 A）、4（中村之 B'）、5（中村之 C）、6（中村之 D）及 E。可合成具有相當於或包含任一括號區

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (11)

域之序列的肽類。名稱 A2、A1、A3 及 B7 係指似乎分別由 HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3 及 HLA-B7 所展現之肽類。

吾等提供用於治療或預防癌症之方法中的端粒酶蛋白質或肽類。於較佳具體實施例中，該方法包含產生對抗端粒酶之 T 細胞反應。該方法可包含對罹患或似乎罹患癌症之哺乳動物（較佳係人類），投藥予治療上有效量之端粒酶蛋白質或肽類，以於該哺乳動物中誘導對抗該端粒酶之 T 細胞反應。

端粒酶特異性 T 細胞可用於靶定可表現端粒酶之細胞。因此，由於生物體中大多數細胞不表現端粒酶，所以彼等便不受影響。然而，表現端粒酶之腫瘤細胞可受靶定並被破壞。因為端粒酶活性已於大多數現今已確定之癌症中偵測到，故吾等期望吾等之物質及方法具有廣泛的利用性。

適於治療之癌症包括（但不限定於）乳癌、前列腺癌、胰臟癌、結腸直腸癌、肺癌、惡性黑素癌、白血症、淋巴癌、卵巢癌、腦癌及膽管癌。

用於本文，術語端粒酶意指一種具有端粒延長活性之核糖核蛋白酵素。端粒酶蛋白質用於本文係指端粒酶之任何蛋白質組成，其包括任何具有催化活性之次單位。

較佳地，該端粒酶蛋白質為哺乳動物端粒酶蛋

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (2)

白質，且最佳係人類端粒酶蛋白質。人類端粒酶蛋白質較佳係經中村等人（1997，科學 277，955-959）所鑑定為 hTRT，及經麥爾森等人（1997，細胞 90，785-795）所鑑定為 hEST 之端粒酶具催化性次單位，彼等之 cDNA 序列分別經寄存為 GenBank 寄存號碼 AF015950 及 AF18167。

術語端粒酶肽類用於本文意指，一種具有相當於存在端粒酶蛋白質中胺基酸序列之序列的胺基酸序列。端粒酶肽類較佳含有 8 至 25 個胺基酸。更佳地，端粒酶肽類較佳含有 9 至 25 個胺基酸。例如，端粒酶肽類較佳含有 9、12、13、16 或 21 個胺基酸。

選擇端粒酶蛋白質或肽類，以使其能夠產生對抗該端粒酶蛋白質（或對抗從其可衍生得端粒酶肽類之端粒酶蛋白質）的 T 細胞反應。於較佳具體實施例中，該所誘發之 T 細胞反應係一種細胞毒性 T 細胞反應。細胞毒性 T 細胞反應可為 CD4+ T 細胞反應，或其可為 CD8+ T 細胞反應。於任一種情況下，該肽類必須能夠以與存在腫瘤細胞，或抗原展現細胞（若需要其先前已發生抗原加工作用）表面上之第 I 類或第 II 類 MHC 形成之複合物表現。

該端粒酶肽類可包括一或多個得自對於端粒酶蛋白質之生物功能為必需的胺基酸基序之胺基酸殘

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

五、發明說明 (3)

基；換言之，其可能至少有部份與此類胺基酸基序重疊。此類胺基酸基序之實例為麥爾森等人（1997，細胞 90，785-795）所鑑定為人類端粒酶具催化性次單位序列 hEST 的基序 1 至 6，亦即選自下列基序

LLRSFFYVTE

SRLRFIPK，

LRPIVNMDYVVG，

PELYFVKVDVTGAYDTI，

KSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCY，

LLLRLVDDFLLVT 及

GCVVNLRKTVV

或選自如中村等人（1997，科學 277，955-959）所鑑定位於 hTRT 序列中之基序 t、1、2、A、B'、C、D 或 E，亦即，下列基序

WLMSVYVVELLSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVMSKLQSIGIRQ
HLK，

EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG，

LRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRV，

PPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKP，

KSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAGI，

LLRLVDDFLLVTPHLTH，

AKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVV

及

HGLFPWCGLLL。

五、發明說明 (14)

可用於本文所述方法及組合物之肽類，經列示於表 1 以及所附之序列鑑識明細表中。

另一組衍生自端粒酶任一處，而可用於本文所述方法及組合物之適宜肽類，經列示於表 2 中。

亦包括具有相當於存在四膜蟲端粒酶相關連之其他蛋白質 p80 及 p95 之哺乳動物類似物胺基酸序列中的胺基酸序列。例如 p80 類似物 TP1 及 TLP1 (哈林頓等人，1997，科學 275，973-977；中山等人，1997，細胞 88，875-884)。

亦包括帶有數個位於 N-末端或 C-末端之胺基酸取代的較大肽類片段，若已確定此等肽類可產生具有適當特異性之 T 細胞純株。

本文所述之肽類特別適用於能夠安全地誘發 CD4+或 CD8+ T 細胞免疫性之疫苗：

a)以合成方式製得該等肽類，而因此不會包括造成轉形之癌症基因，或其他可能產生有害影響之位點或物質，

b)該等肽類可單獨用於誘導細胞性免疫反應，

c)該等肽類可受靶定產生特別之 T 細胞反應，而無發生其他不希望反應之副作用。

本文所述之端粒酶肽類或蛋白質可以介於 1 微克 (1 μ g)至 1 克 (1g)範圍之量，投藥予人類患者或欲接受疫苗接種之個體。

於較佳實施例中，係將端粒酶蛋白質或肽類以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(ㄨ)

醫藥組合物之形式提供予患者。端粒酶蛋白質或肽類可呈蛋白質混合物，或蛋白質與肽類之混合物，或肽類混合物進行投藥。該醫藥組合物可另包括有用之添加劑、稀釋劑、安定劑或該項技藝種已知之類似物。

該醫藥組合物可包含一或多種端粒酶蛋白質或肽類。蛋白質或肽類混合物可為下列之任一種：

(a)具有不同序列（例如相當於端粒酶蛋白質序列之不同部份）的肽類混合物；

(b)具有重疊序列，但適用於配合不同 HLA 等位基因之肽類混合物；

(c)含混合物(a)與(b)二者之混合物；

(d)含數種混合物(a)之混合物；

(e)含數種混合物(b)之混合物；

(f)含數種混合物(a)與數種混合物(b)之混合物

；

於各情形下，亦可使用對應於不同端粒酶蛋白質，例如端粒酶具催化性次單位及四膜蟲 p80 或 p95 類似物，之蛋白質或肽類的混合物。

另供選擇地，可將混合物中之端粒酶肽類彼此互相進行共價性鍵聯，而形成較大之多肽類或甚至形成環狀多肽類。可藉由將一或多種端粒酶蛋白質或肽類與醫藥上可接受之載體或稀釋劑混合，而製得該醫藥組合物。

五、發明說明 (16)

該醫藥組合物亦可包含至少一種能夠誘發對抗致癌基因，或突變型腫瘤抑制蛋白質或肽類之 T 細胞反應的肽類。另供選擇地，可將端粒酶蛋白質或肽類與此等肽類同時，或依視需要之順序進行投藥。致癌基因蛋白質之實例為 p21-*ras* 蛋白質 H-*ras*、K-*ras* 與 N-*ras*、abl、gip、gsp、ret 及 trk。較佳地，該致癌基因蛋白質或肽類為一種 p21-*ras* 蛋白質或肽類，例如，經描述於吾等之國際專利申請案 PCT/N092/00032（公開案號 WO92/14756）的 p21-*ras* 肽類。腫瘤抑制蛋白質包括 p53 及 Rb（成視網膜細胞瘤）。此等醫藥組合物可藉由將一或多種端粒酶蛋白質或肽類，及突變型腫瘤抑制蛋白或致癌基因蛋白質或肽類，共同與醫藥上可接受之載體或稀釋劑混合而製得。

用於本文，術語突變型意指具有下列一或多種情形之野生型序列：定點突變（鹼基轉換或鹼基顛換）、缺失、插入、重複鹼基轉換或鹼基顛換。術語醫藥組合物不僅涵括可用於治療癌症患者之組合物，其亦包括可用於與預防有關之組合物，亦即疫苗組合物。

端粒酶肽類或蛋白質係投藥予需要此項治療或預防之人類個體。該項投藥可進行一或數次，為能適於建立或維持所希望之 T 細胞免疫反應。該等肽類可與細胞活素及/或生長因子，亦即間白質-2

五、發明說明 (7)

(IL-2)、間白質-12 (IL-12)、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等類共同投藥 (同時或分別進行)，以如該項技藝已知增強免疫反應。端粒酶蛋白質或肽類可單獨或與其他物質組合用於疫苗或治療組合物中。例如，該等蛋白質或肽類可呈脂肽共軛物之形式提供，其已知可誘導高親和性細胞毒性 T 細胞反應 (迪爾斯，1989，自然 342)。

以上所提及做為可能醫藥組合物組成份之肽類或蛋白質，可以編碼特定肽類或蛋白質之核酸形式提供。因此，該醫藥組合物可包含肽類及/或蛋白質本身，或與核酸組合，或其可包含核酸混合物。

端粒酶肽類或蛋白質可以 DNA 疫苗之形式投藥予個體。編碼端粒酶肽類或蛋白質之 DNA 可呈經選殖之質體 DNA 或合成型寡核苷酸的形式。該 DNA 可與細胞活素 (例如 IL-2)，及/或其他共-刺激性分子一起遞送。該等細胞活素及/或共-刺激性分子本身可以質體或合成型寡核苷酸 DNA 的形式遞送。

針對 DNA 疫苗之反應已顯示可藉由免疫刺激性 DNA 序列 (ISS) 之存在而增加。此等可採取含有甲基化 CpG，根據下式之六聚體基序的形式：5'-嘌呤-嘌呤-CG-嘧啶-嘧啶-3'。因此，吾等之 DNA 疫苗可將此等或其他 ISS，併入編碼端粒酶肽類或蛋白質之 DNA，併入編碼細胞活素及/或共-刺激性

五、發明說明 (8)

分子之 DNA，或併入該二者中。有關 DNA 疫苗接種優點之回顧係由泰夫等人所提出（1998，現今免疫學，19(2)，89-97）。

吾等描述一種治療罹患癌症之患者的方法，該方法包含經由以端粒酶蛋白質或肽類進行活體內或得自活體刺激，而誘發 T-細胞反應。該端粒酶蛋白質或肽類亦可用於患者疫苗接種之方法中，以獲得針對癌症之抗性。適宜之疫苗接種方法包含經由以端粒酶蛋白質或肽類進行活體內或得自活體刺激，而誘發 T-細胞反應。吾等亦描述一種治療或預防癌症之方法，其包含將治療上有效量之端粒酶蛋白質或肽類投藥予罹患或疑似罹患癌症之哺乳動物，以始能於該哺乳動物中誘導對抗端粒酶之 T 細胞反應。

本文所描述之肽類可藉由習知製成，例如藉由各種該項技藝已知之肽類合成方法製得。另供選擇地，彼等可為經由裂解（例如使用溴化氰），及後續純化所製得之端粒酶蛋白質。亦可使用酵素裂解作用。端粒酶蛋白質或肽類亦可呈經表現之重組型蛋白質或肽類形式。

編碼端粒酶肽類之核酸可藉由寡核苷酸合成作用製得。此可藉由任一該項技藝可利用之各種方法製得。可使用習知基因庫篩選方法自基因組或 cDNA 庫選殖出編碼端粒酶蛋白質之核酸。探針可

五、發明說明 (9)

對應於任何已知端粒酶基因序列之一部份。另供選擇地，該核酸可藉由使用聚合酶鏈反應(PCR)而獲得。該核酸較佳為 DNA，且可適宜地經選殖至載體中。可藉由使用適宜限制酵素產生次選殖株。經選殖或次選殖得之 DNA 可送入適宜宿主，例如細菌宿主中增殖。另供選擇地，該宿主可為真核生物體，例如酵母菌或桿狀病毒。可藉由於適宜宿主中表現而製得該等端粒酶蛋白質或肽類。於此個案中，係將 DNA 選殖於表現載體中。可利用各種市售表現套組。為此目的，可使用該等描述於馬尼阿提斯等人(1991，分子選殖：實驗室手冊，冷泉港，紐約，冷泉港實驗室出版)及哈洛與連恩(1988，抗體：實驗室手冊，冷泉港，紐約，冷泉港實驗室出版)之方法。

實驗方法

肽類係藉由使用連續流體固相肽類合成方法合成得。使用具有適當側鏈保護之 N-a-Fmoc-胺基酸。將 Fmoc-胺基酸活化呈五氟苯基酯類以進行偶合，或於偶合作用之前藉由使用 TBTU 或二異丙基羰二亞胺活化。使用 20%存於 DMF 之六氫吡啶，選擇性將 Fmoc 於各偶合作用後移除。藉由含有適當清除劑之 95% TFA，進行自樹脂裂解以及最後將側鏈保護去除之作用。純化該等肽類，並以逆相(C18) HPLC 進行分析。肽類之特性係藉由使用電

五、發明說明 (30)

噴射質譜術確定 (芬尼根 mat SSQ710) 。

為供用於癌症疫苗及以希望有效之 T 細胞免疫反應為主針對特殊癌症療法的方法，必須符合三種條件：

(a) 該肽類長度至少為 8 個胺基酸，且為端粒酶蛋白質之片段，及

(b) 該肽類能夠 (以其全長或經由抗原展現細胞加工後) 誘導 T 細胞反應。

下列實驗方法可用於決定一特定肽類是否符合此三種條件。首先應測定該特定肽類是否可於活體外誘發 T 細胞免疫反應。將亦需要確定該合成肽類是否相當於 (或能夠於加工後產生) 對應於存在帶有端粒酶之癌症細胞，或已將天然端粒酶進行加工之抗原展現細胞中，的肽類片段之肽類片段。亦可測定得於活體內經由端粒酶肽類疫苗接種，所誘發之 T 細胞特異性。

需要測定表現端粒酶之腫瘤細胞，是否可被自經端粒酶肽類疫苗接種後之癌症患者，所得周邊血液獲得的 T 細胞純株殺死。於選殖存於周邊血液單核細胞 (PBMC) 中之 T-細胞母細胞後，獲得 T 細胞純株。肽類疫苗接種程序包括數次活體內注射肽類，與 GM-CSF 或另一種慣用之佐劑。T 細胞之選殖係藉由將反應之 T 細胞母細胞，以每槽含 5 個母細胞之濃度塗佈於寺琦平板上。每槽含有 2×10^4

五、發明說明 (2 \)

自身、經照射(30 Gy)之 PBMC 做為飼養細胞。將細胞以 25 mM 所選之端粒酶類及 5 U/毫升重組型間白質-2 (rIL-2) (艾默遜, 亞力斯貝里, 英國), 於總體積為 20 毫升中進行增殖。待 9 天後, 將 T 細胞選殖株轉移至含有 1 毫克/毫升植物凝集素 (PHA, 威爾康, 達特福, 英國)、5 U/毫升 rIL-2 及同種異型、經照射(30 Gy)之 PBMC (每槽 2×10^4) 做為飼養細胞之平底 96 槽平盤 (科斯達, 劍橋, MA) 上。將生長中之選殖株進一步置於具有 PHA/rIL-2, 及同種異型、經照射(30 Gy)之 PBMC (每槽 2×10^4) 做為飼養細胞之平底 96 槽平盤中延展, 並經 4 至 7 天後篩選酶類活性。

篩選 T 細胞純株, 以供進一步鑑定。測定出 T 細胞純株之細胞表面表型, 以確定該 T 細胞純株為 CD4+ 或 CD8+。將 T 細胞純株與自身腫瘤細胞標靶物, 於不同之效應物對標靶物比例下進行培育, 以測定是否發生腫瘤細胞之溶解。溶解表示 T 細胞具有對抗由腫瘤所衍生抗原, 例如端粒酶蛋白質之反應活性。為證實所辨識之抗原與端粒酶蛋白質相關連, 且為鑑定得將該所推測展現予該 T 細胞純株之 HLA 第 I 類或第 II 類分子, 遂於細胞毒性分析中使用帶有一或多種普遍存在患者中之 HLA 第 I 類或第 II 類分子, 的不同端粒酶表現腫瘤細胞系做為標靶細胞。將標靶細胞以 ^{51}Cr 或 ^3H -

五、發明說明 (ㄣ)

胸苷 (9.25×10^4 Bq/毫升) 進行標定過夜，洗滌一次並以每槽含 5000 細胞之濃度平佈於 96 槽平盤中。將 T 細胞以不同之效應物對標靶物比例加入，並將平盤於 37℃ 下培育 4 小時，然後收集並於液態閃爍計數器 (帕卡得 Topcount) 中計數。例如，可使用膽癌細胞系 T24 (12Val^+ , HLA-A1⁺, B35⁺)、黑色素瘤細胞系 FMEX (12Val^+ , HLA-A2⁺, B35⁺)、及結腸癌細胞系 SW 480 (12Val^+ , HLA-A2⁺, B8⁺)、或任何其他端粒酶陽性細胞系做為標靶細胞。可使用不表現端粒酶蛋白質之適宜細胞系做為對照組，且應該不會被溶解。特定細胞系之溶解表示，所測試之 T 細胞純株辨識與由該細胞系所表現 HLA 第 I 類或第 II 類亞型有關之經內源性加工所得的端粒酶表位。

T 細胞純株之 HLA 第 I 類或第 II 類限制作用，可藉由阻斷實驗測定得。可使用對抗 HLA 第 I 類抗原之抗體，例如泛反應性 HLA 第 I 類單株抗體 W6/32，或對抗 HLA 第 II 類抗原之抗體，例如抗 HLA 第 II 類 DR、DQ 及 DP 抗原之單株抗體 (B8/11、SPV-L3 與 B7/21)。使用對抗 HLA 第 I 類或第 II 類分子之單株抗體 (終濃度為 10 毫克/毫升)，評估該 T 細胞純株抗自身腫瘤細胞系之活性。如上所述於 96 平盤中建立三重複組，並將標靶細胞於添加 T 細胞之前，於 37℃ 下預先培育 30

五、發明說明(27)

分鐘。

可使用肽類脈衝實驗測定 T 細胞純株之良好特異性。為鑑定出正確被 T 細胞純株辨識之端粒酶肽類，平行測試一組含九聚體之肽類。將經 ^{51}Cr 或 ^3H -胸苷標定，經溫和酸溶析出之自身纖維母細胞，以每槽含 5000 細胞之濃度平佈於 96 槽平盤中，並於添加 T 細胞前先以濃度為 1 mM 之肽類，及 b2-微球蛋白（2.5 毫克/毫升），於 5% CO_2 培養箱中於 37℃ 下進行脈衝。於 96 平盤中設計三重複組分析，並以效應物對標的物為 5 對 1 之比例培育 4 小時。對照組可包括單獨培育之 T 細胞純系，與有或無肽類存在下之 APC 共培育，或與無關黑素瘤相連結肽類 MART-1/Melan-A 肽類共培育之 T 細胞純系。

可使用另一用以測定 T 細胞純株之良好特異性的方案。於此另一方案中，係使用 TPA 缺陷 T2 細胞做為抗原展現細胞。此細胞系僅表現少量 HLA-A2 抗原，但可藉由添加 b2-微球蛋白誘導細胞表面上之 HLA 第 I 類抗原增加。將經 ^3H -胸苷標定之標靶細胞與濃度為 1 mM 之不同測試肽類與對照組肽類，及 b2-微球蛋白（2.5 毫克/毫升）於 37℃ 下培育一小時。經肽類脈衝後，將標靶細胞充分洗滌、計數並以每槽含 5000 細胞之濃度平佈於 96 槽平盤中，隨後將 T 細胞加入。將平盤於 37℃ 下

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

四、中文發明摘要（發明之名稱：

)

抗原性肽類

本發明關於誘發 T 細胞所介導免疫反應之蛋白質或肽類，且關於用於抗-癌症治療之癌症疫苗及組合物，其包含此類蛋白質或肽類片段。本發明亦關於包含該等蛋白質或肽類之醫藥組合物，及用於產生能夠於哺乳動物中辨識且破壞腫瘤細胞之 T 淋巴細胞。

更特別地，本發明提供在治療或預防癌症之方法中所使用的端粒酶蛋白質或肽類。於較佳具體實施例中，該方法包含產生可對抗端粒酶之 T 細胞反應。

英文發明摘要（發明之名稱：

ANTIGENIC PEPTIDES

)

Abstract

This invention relates to proteins or peptides which elicit T cell mediated immunity, and to cancer vaccines and compositions for anti-cancer treatment comprising such proteins or peptide fragments. This invention also relates to pharmaceutical compositions comprising the proteins or peptides and methods for generating T lymphocytes capable of recognising and destroying tumour cells in a mammal.

More specifically, a telomerase protein or peptide for use in a method of treatment or prophylaxis of cancer is provided. In a preferred embodiment, the method comprises generating a T cell response against telomerase.

88115173

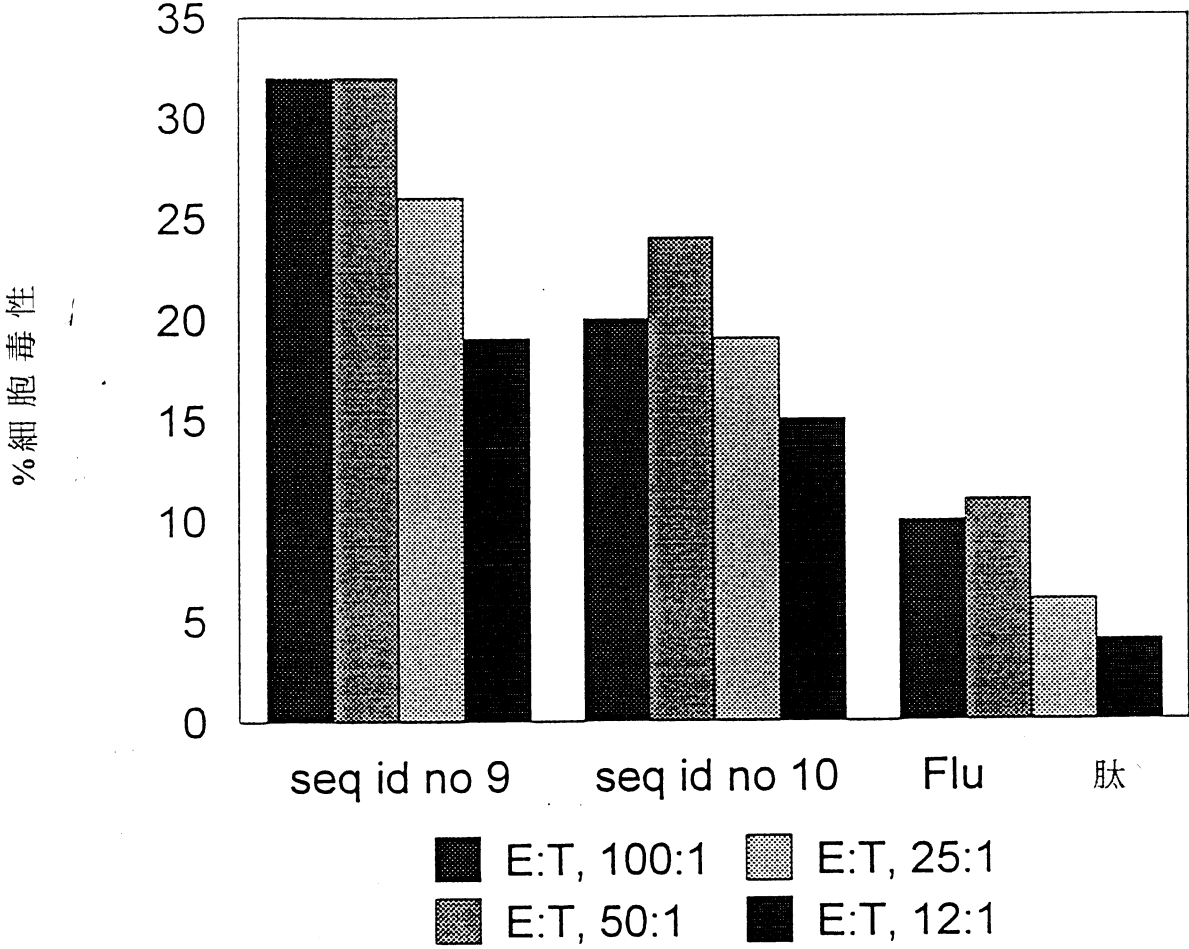


圖 1

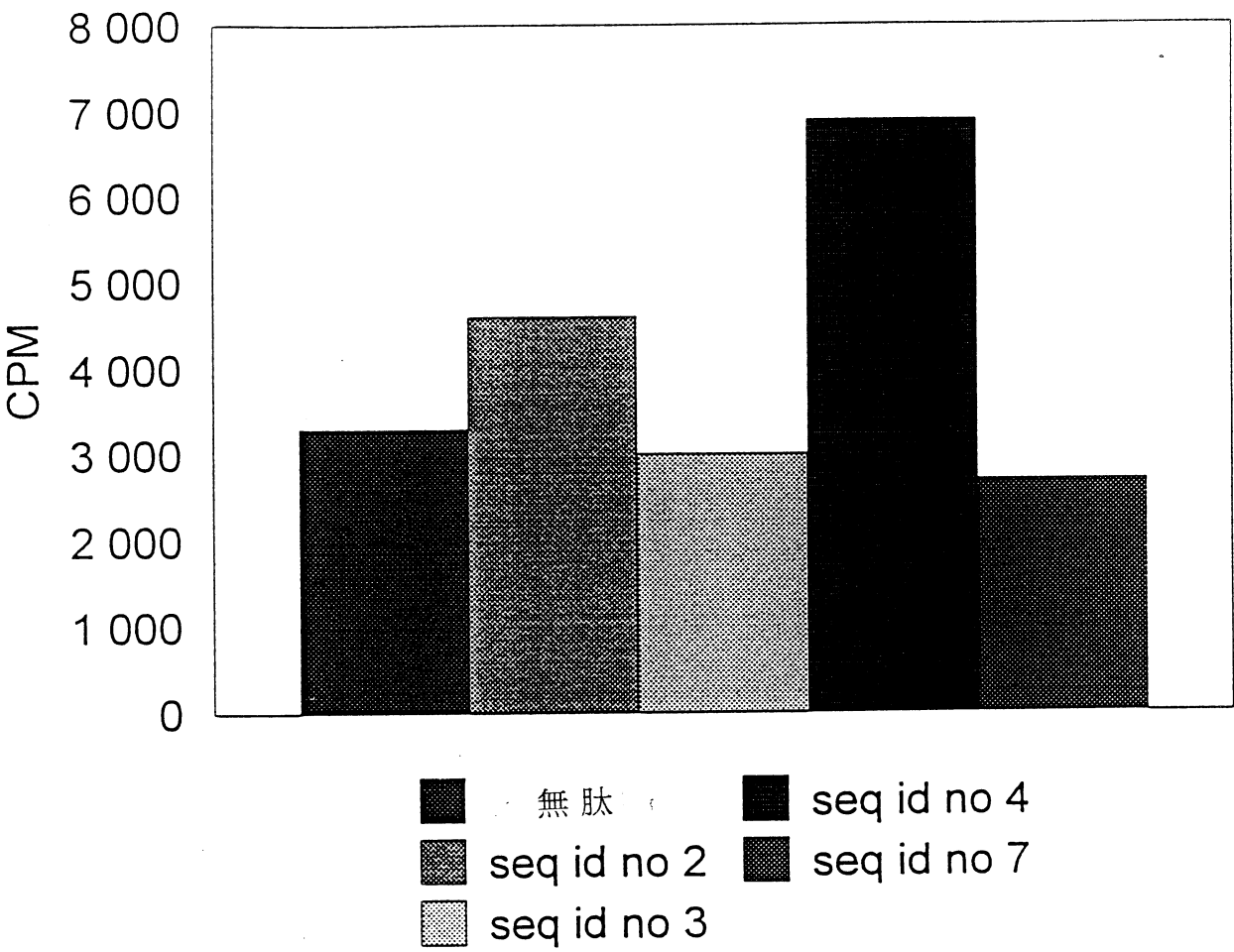


圖 2

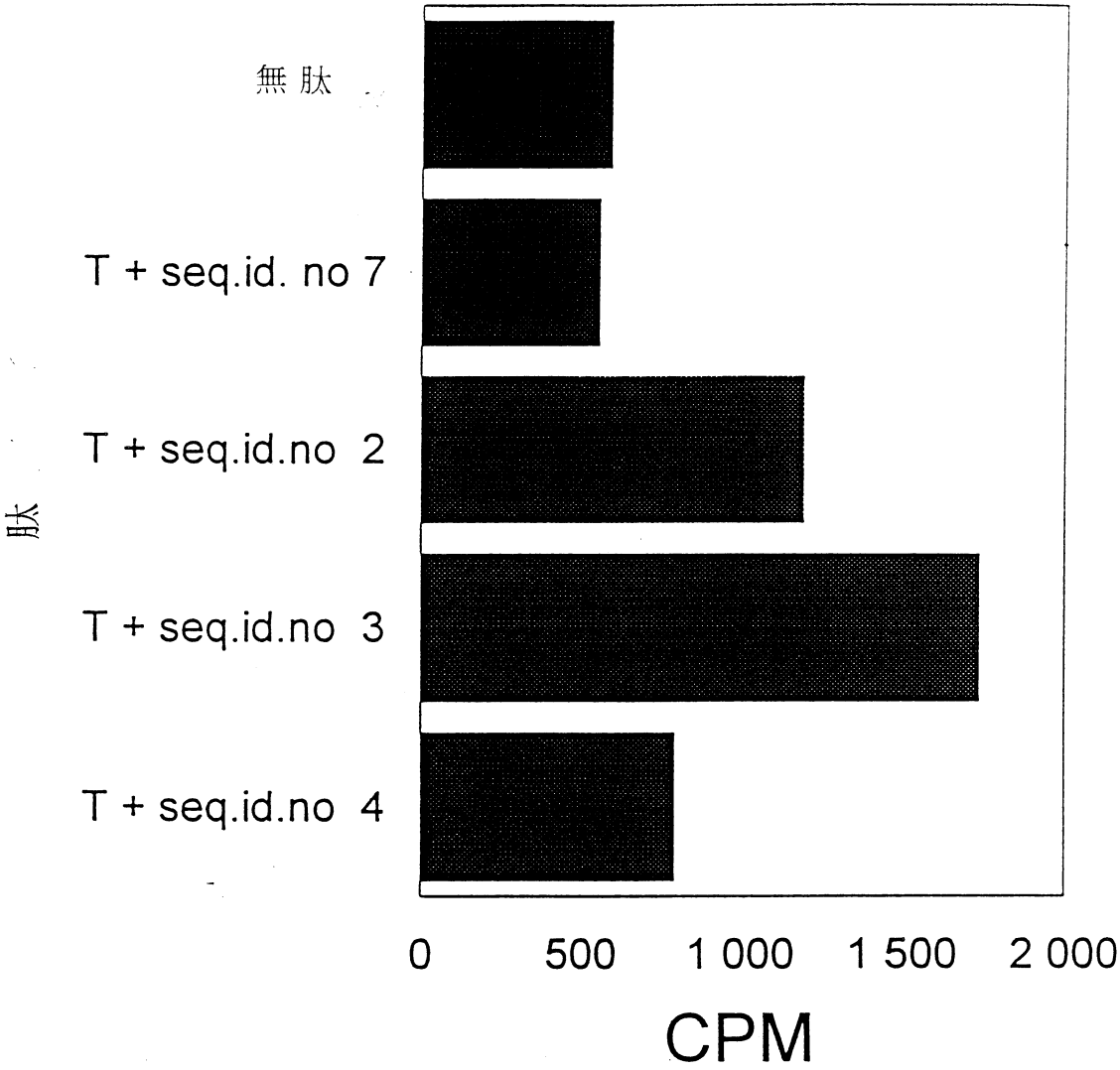
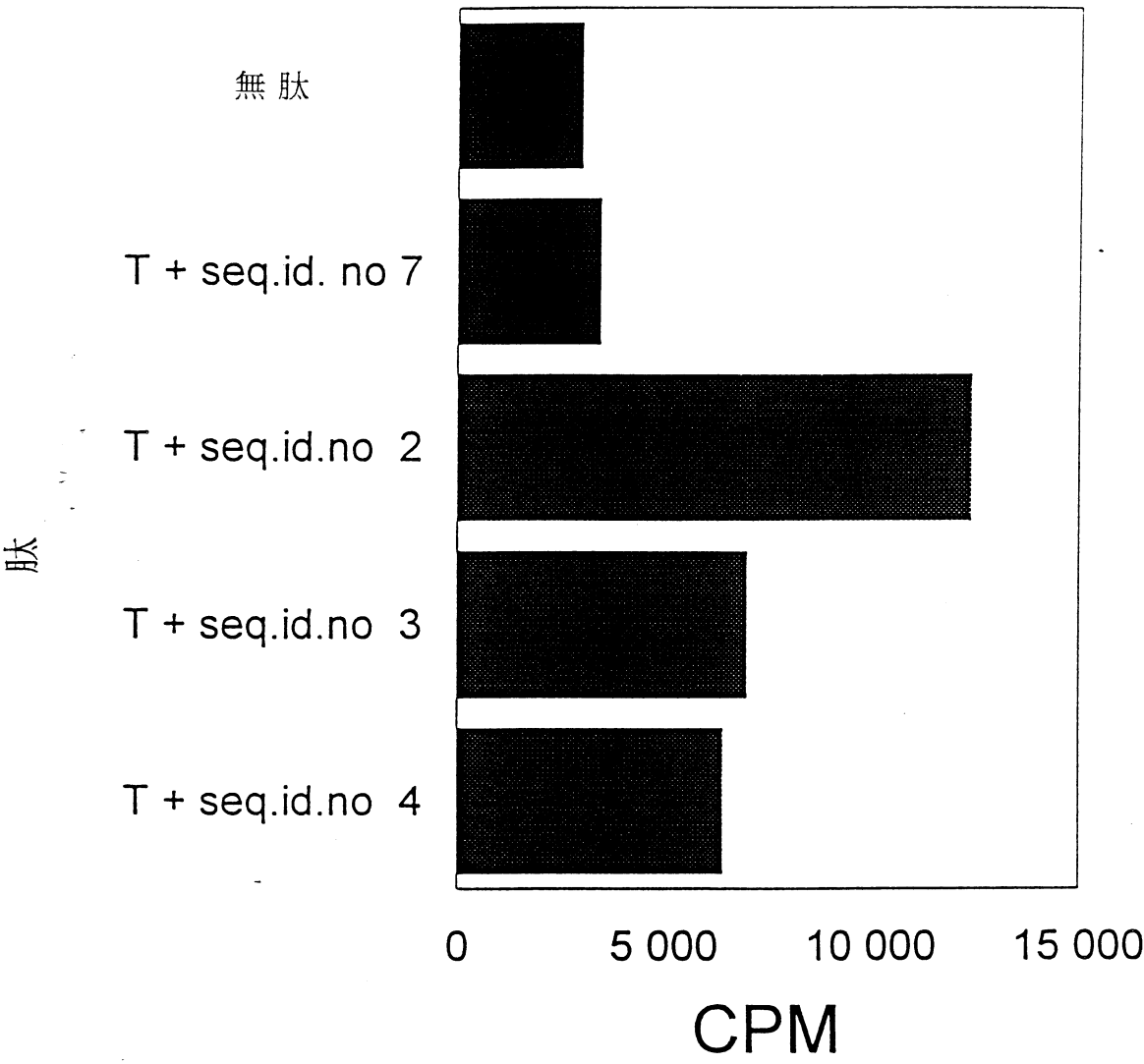


圖 3



申請日期	88-9-3
案 號	88115723
類 別	C12N 9/12, 5/06, A61K 38/45, 39/39

A4
C4

91 8 7

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	抗原性肽類
	英 文	Antigenic Peptides
二、發明 創作人	姓 名	1.加斯塔 高德納克 2.瓊 亞曼 艾瑞克森 3.英格維 沙特達 4.瑪莉安 克雷普 傑森 5.莫娜 慕勒 6.史坦 沙波 拉森
	國 籍	1.2.3.4.5.6.挪威
三、申請人	住、居所	1.挪威 N-0310 奧斯陸,烏倫奇 70 號挪斯克鐳醫院 2.挪威 N-3916 波斯格恩,必尤恩維特街 37 號 3.挪威 N-0310 奧斯陸,烏倫奇 70 號挪斯克鐳醫院 4.挪威 N-0310 奧斯陸,烏倫奇 70 號挪斯克鐳醫院 5.挪威 N-3925 波斯格恩,史庫克羅托彭 8 號 6.挪威 N-0310 奧斯陸,烏倫奇 70 號挪斯克鐳醫院
	姓 名 (名稱)	傑姆發克斯公司
三、申請人	國 籍	挪威
	住、居所 (事務所)	挪威,N-0310 歐羅斯市,挪瑞芬街 7 號
三、申請人	代 表 人 姓 名	裘恩.阿慕德.伊瑞克森

裝

訂

線

五、發明說明(之)

此使得 T 細胞亦能夠可辨識從細胞內抗原所衍生得之肽類。

T 細胞可辨識衍生自腫瘤細胞內任何處之異常肽類，其係與存在腫瘤細胞表面上之 MHC 分子有關。接著，T 細胞可被活化而將帶有該異常肽類之腫瘤細胞消滅。於包含鼠類腫瘤之實驗模式中已顯示，細胞內“本身之”蛋白質發生定點突變，可產生腫瘤排斥抗原，其包含與正常肽差異在於單一個胺基酸之肽類。辨識此等存在腫瘤細胞表面上，與主要組織相容性複合體(MHC)分子有關之肽類的 T 細胞，能夠殺死腫瘤細胞並因此將腫瘤從宿主排除(布恩等人，1989，細胞 58，293-303)。

人類 MHC 分子正常下係指 HLA (人類白細胞相關抗原) 分子。有兩類主要的 MHC 分子，即第 I 與第 II 類。第 I 類 HLA 分子係由 HLA A、B 及 C 亞基因座所編碼，且主要活化 CD8+細胞毒性 T 細胞。另一方面，第 II 類 HLA 分子主要活化 CD4+T 細胞，且係由 DR、DP 及 DQ 亞基因座所編碼。每一個體正常皆具有六種不同的第 I 類 HLA 分子，其中該 A、B 及 C 三亞群各編碼兩對偶基因，而於某些個案中，因為相同 HLA 對偶基因發生兩次，故使不同的第 I 類 HLA 分子數目減少。

HLA 基因產物具有高多形性。不同個體表現與於其他個體中所發現者不同之相異 HLA。此解

五、發明說明 (q)

然而誠如吾等目前所瞭解，先前未有人曾暗示端粒酶可做為用於 T 細胞所介導所介導之療法中的有用標靶，或曾指出端粒酶肽類或蛋白質可用於治療或預防癌症。

根據本發明之一層面，吾等提供用於治療或預防癌症之方法中的端粒酶蛋白質或肽類。

根據本發明之第二層面，係提供用於治療或預防癌症之方法中的核酸，該核酸能夠編碼如本發明第一層面中所提供之端粒酶蛋白質或肽類。

根據本發明之第三層面，吾等提供一種醫藥組合物，其包含至少一種如本發明第一或第二層面中所提供之端粒酶蛋白質或肽類或核酸，以及醫藥上可接受之載體或稀釋劑。

根據本發明之第四層面，吾等提供一種用以製備如本發明第三層面中所提供之醫藥組合物的方法，該方法包含將至少一種如本發明第一或第二層面中所提供之端粒酶蛋白質或肽類或核酸，與醫藥上可接受之載體或稀釋劑混合。

根據本發明之第五層面，係提供一種醫藥組合物，其包含至少一種如本發明第一層面中所提供之端粒酶蛋白質或肽類，與至少一種能夠誘導對抗致癌基因或突變型腫瘤抑制蛋白質或肽類之 T 細胞反應的肽類之組合，以及醫藥上可接受之載體或稀釋劑。

五、發明說明(4)

於 5% CO₂ 中進行培育四小時，然後收取細胞。對照組可包括單獨培育，與有或無肽類存在下之標靶細胞共培育之 T 細胞純系。於 96 平盤中設計三重複組分析，其中效應物對標的物之比例為 20 對 1。

T 細胞純株對上述所鑑定得特定肽類之敏感性，亦可藉由使用劑量-反應實驗測定得。可使用經肽類敏化之纖維母細胞做為標靶細胞。將標靶細胞如上所述以特定肽類進行脈衝以良好特異性，惟差異在於添加 T 細胞前，將不同濃度之肽類加入。對照組包括單獨之標靶細胞，以及經無關黑素瘤相連結肽類 Melan-A/Mart-1 肽類脈衝之標靶細胞。

圖式簡單說明

圖 1 (Fig.1)描述於經具有鑑識序列 9 及 10 之端粒酶肽類免疫的 HLA-A2 (A2/K^b)轉殖基因小鼠中誘導具端粒酶反應性細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL's)。

圖 2 (Fig.2)列示得自罹患結腸癌患者(TT)之周邊血液 T 細胞以具有鑑識編號 2、3、4 及 7 之端粒酶(hTERT)衍生得肽類進行活體外刺激的結果。

圖 3 (Fig. 3)列示得自罹患末期胰臟癌患者之腫瘤浸入淋巴細胞(TILs)的反應性。

五、發明說明(✓)

圖 4 (Fig. 4)列示得自罹患末期胰臟癌患者之腫瘤浸入淋巴細胞(TILs)的反應性。

生物學實驗/圖式之敘述：

圖 1

圖 1 (Fig.1)描述於經具有鑑識序列 9 及 10 之端粒酶肽類免疫的 HLA-A2 (A2/K^b)轉殖基因小鼠中誘導具端粒酶反應性細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL's)。使用標準受 HLA-A2 限制之流感(58-66)肽類做為對照組。對三組各五隻小鼠給予兩週皮下注射以 10^7 個未經照射、經肽類脈衝(100 微克/毫升)之同系脾臟細胞。待第二次注射一週後，將小鼠犧牲並收取其脾臟。以標準技術製備脾臟細胞，並將得自致敏動物之細胞於活體外，藉由將其與做為抗原展現細胞之經肽類脈衝(10 微克/毫升)、未經照射自身脾臟細胞共培養進行再刺激，隨後於 ^{51}Cr 釋出分析中測試對抗經 HLA-A2 (A2/K^b)轉感染之 hTERT 表現標靶細胞的細胞毒性。

圖 1 左側各欄列示經對照組肽類(流感 58-66)轉感染之裘凱特細胞被老鼠經具有鑑識序列 9 之肽類，於不同效應物對標的細胞比例下致免後所得的 T 細胞殺死。於所有效應物對標的細胞比例下，觀察到高於背景值之特異性細胞毒性。中間部份各欄列示以得自經具有鑑識序列 10 之肽類致免

五、發明說明(26)

之老鼠的 T 細胞觀察到之相似數據。僅當使用得自經端粒酶肽類脈衝小鼠之 T 細胞做為效應細胞時，始觀察到裘凱特細胞顯著被殺死，因此當使用得自經流感肽類致免小鼠之脾臟細胞做為效應者時，若標靶細胞係以非相關肽類（黑素皮質素受體 1 肽類，MC1R244）脈衝時，僅觀察到背景程度之裘凱特細胞殺死作用，參見圖 1 右側各欄所示。此等結果證明，具有鑑識序列 9 及 10 之肽類於活體內為免疫生成性，且於致免反應時可於帶有共通人類 MHC 分子 HLA-A2 之溫血動物中產生免疫反應。此發現指示，具有鑑識序列 9 及 10 之肽類亦可於帶有 HLA-A2，及其他能夠與此等肽類結合之 HLA 第 I 類分子的人類中做為癌症疫苗。而且，此等結果證明，由 T 細胞白血症裘凱特細胞系所表現之 hTERT，可受該細胞系之蛋白分解機制加工，而產生相同或類似於具有鑑識序列 9 及 10 之肽類的肽片段。綜合此等觀察指出，癌症患者或具有發展成癌症危險之患者於免疫接種以此等肽類後，可導致有效殺死表現端粒酶 hTERT 次單位之腫瘤細胞。

圖 1 描述經 HLA-A2 轉感染之裘凱特細胞，以得自經該圖所示致免小鼠之效應細胞產生之細胞毒性。將標靶細胞以 ^{51}Cr （0.1 為居里/100 微升細胞懸浮液）於 37°C 下標定 1 小時，洗滌兩次並以肽

五、發明說明 (27)

類 (1 微克/毫升) 於 37°C 下進行脈衝 1 小時，隨後再洗滌。對每槽存在 96 槽 v-底微量滴定平盤中，之兩千個經標定、經脈衝之標靶細胞進行篩檢，並將效應細胞 (2.5×10^4 至 2×10^5) 加至該等槽中。將培養物於 37°C 下培育 4 小時，並收取上清液於加瑪-計讀器中進行測試。圖 1 中之結果係表現呈以下式計算得之比細胞毒性：

$$\frac{(\text{cpm 所釋出之實驗值} - \text{cpm 自發性釋出值})}{(\text{cpm 總值} - \text{cpm 自發性釋出值})} \times 100$$

圖 2

圖 2 (Fig.2) 列示得自罹患結腸癌患者 (TT) 之周邊血液 T 細胞，以具有鑑識編號 2、3、4 及 7 之端粒酶 (hTERT) 衍生得肽類進行活體外刺激的結果。如下所述進行活體外培養：將三重複組 10^5 單核細胞於補充以 15% 匯集經熱去活化人類血清之 X-VIVO 10 培養基中，於溼度調節培養箱中於 5% CO_2 下培育 6 天。於培養全程中肽類係以終濃度為 30 微克/毫升存在培養基中。以不含肽類之培養物做為對照組。當 T 細胞以具有鑑識序列 4 之肽類刺激時，觀察到高於背景值之增殖反應。此等結果證明，得自癌症患者之血液含有特異於衍生自端粒酶 (hTERT) 之肽類的循環性 T 細胞。此等結果證明，端粒酶 (hTERT) 之酵素性次單位於人類中為免疫生成性，且當其由患者中生長中之腫瘤過度表現

五、發明說明 (28)

時，可能自發地產生端粒酶特異性 T 細胞反應。而且，於此患者中端粒酶特異性反應之一組成份係對抗本文所述具有鑑識序列 4 之肽類。此項發現表示具有鑑識序列 4 之肽類亦可用做為人類疫苗。該圖描述習知 T 細胞增殖分析之結果，其中係將周邊血液單核細胞 (10^5) 與所指示之肽類，以三重組進行培養 7 天然後收取之。為測量培養物之增殖能力，遂於收取細胞前，先將 ^3H -胸苷 (3.7×10^4 Bq/槽) 加至該培養物過夜。取三重組之平均每分鐘讀數 (cpm)。

圖 3 及 4

圖 3 及 4 (Fig. 3 及 Fig. 4) 列示得自罹患末期胰臟癌患者之腫瘤浸入淋巴細胞 (TILs) 的反應性。自腫瘤活檢體取得 T 細胞，並將其成功地於活體外繁殖以建立 T 細胞系。該細胞系為 CD3+、CD4+ 及 CD8-，且特異地於對端粒酶肽類之反應中增殖。圖 3 中之結果顯示 T 細胞當與僅含培養基之對照組相較時，可辨識具有鑑識序列 2 及 3 之肽類。圖 4 中之結果顯示 T 細胞辨識具有鑑識序列 2 之肽類。藉由與重組型人類間白素 2 (rIL-2) 共培養使 TILs 耗盡，並於 14 天後於使用具有鑑識序列編號 2、3、4 及 7 之肽類的標準增殖分析中進行測試。

五、發明說明(29)

表 1

LMSVYVVEL
 ELLRSFFYV
 YVELLRSF
 VVELLRSF
 SVYVVELLR
 VELLRSFFY
 YVTETTFQK
 RLFFYRKSV
 SIGIRQHLK
 RPALLTSRL
 ALLTSRLRF
 LLTSRLRFI
 RPIVNMDYV
 LRPIVNMDY
 YVVGARTFR
 VVGARTFRR
 GARTFRREK
 ARTFRREKP
 PPELYFVKV
 ELYFVKVDV
 FVKVDVTGA
 IPQDRLTEV
 DRLTEVIAS
 RLTEVIASI
 IPQGSILSTL
 ILSTLLCSL
 LLRLVDDFL
 RLVDDELLV
 VPEYGCVVN
 VPEYGCVVNL
 TLVRGVPEY
 FLRTLVRGV
 GVPEYGCVV
 VVNLRKTVV
 GLFPWCGLL

FLHWLMSVYVVELLRSFYVTE
 EARPALLTSRLRFIPK
 DGLRPIVNMDYVVGAR
 GVPEYGCVVNLRKVVNF

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(30)

表 2

YAETKHFLY
ISDTASLCY
DTDPRRLVQ
AQDPPPELY
LTDLQPYMR
QSDYSSYAR

ILAKFLHWL
ELLRSFFYV
LLARCALFV
WLCHQAFL
RLVDDFLLV
RLFFYRKSV
LQLPFHQV
RLGPQGWRL
SLQELTWKM
NVLAFGFAL
VLLKTHCPL
FLLVTPHLT
TLTDLQPYM
RLTEVIASI
FLDLQVNSL
SLNEASSGL
ILSTLLCSL
LLGASVLGL
VLAFGFALL
LQPYMRQFV
LMSVYVVEL
RLPQRYWQM
RQHSSPWQV
YLPNTVTDA
NMRRKLEGV
RLTSRVKAL
LLQAYRFHA
LLDTRTLEV
YMRQFVAHL
LLTSRLRFI
CLVCVPWDA
LLSSLRPSL

五、發明說明 (31)

表 2 (續)

FMCHHAVRI
LQVNSLQTV
LVAQCLVCV
CLKELVARV
FLRNTKKFI
ALPSDFKTI
VLVHLLARC
VQSDYSSYA
SVWSKLQSI
KLPGTTLTA
QLSRKLPGT
ELYFVKVDV
GLLLDTRTL
WMPGTPRRL
SLTGARRLV
VVIEQSSSL
LPSEAVQWL
QAYRFHACV

GLFDVFLRF
KLFGVLRLK
RLREEILAK
TLVRGVPEY
GLPAPGARR
GLFPWCGLL
KLTRHRVTY
VLPLATFVR
ELVARVLQR

DPRRLVQLL
FVRACLRRRL
SVREAGVPL
AGRNMRRL
LARCALFVL
RPAEEATSL
LPSEAVQWL
LPGTTLTAL
RPSFLLSSL
LPNTVTDAL
RPALLTSRL

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

五、發明說明 (32)

表 2 (續)

RCRAVRSLL
MPRAPRCRA

GIRRDGLLL
VLRLKCHSL
YMRQFVAHL
SLRTAQTQL
QMRPLFLEL
LLRLVDDFL
FVQMPAHGL
HASGPRRRL
VVIEQSSSL
RVISDTASL
CVPAAEHRL
RVKALFSVL
NVLAFGFAL
LVARVLQRL
FAGIRRDGL
HAQCPYGV
LAQDPPPEL
AYRFHACVL
HAKLSLQEL
GAKGAAGPL
TASLCYSIL
APRCRAVRS
GARRLVETI
AQCPYGVLL
HAKTFLRTL
EATSLEGAL
KAKNAGMSL
AQTQLSRKL
AGIRRDGLL

VLRLKCHSL
ILKAKNAGM
DPRRLVQLL
GAKGAAGPL
FAGIRRDGL
GARRRGGSA
HAKTFLRTL

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(35)

表 2 (續)

LARCALFVL
EHRLREEIL
NMRRKLFGV

CAREKPQGS
LTRHRVTYV

RRFLRNTKK
RRDGLLLRL
RREKRAERL
RRLVETIFL
LRFMCHHAV
RRYAVVQKA
KRAERLTSR
RRKLFGVLR
RRRGGASASR
RRLPRLPQR
RRLGPQGWR
LRGSGAWGL
HREARPALL
VRRYAVVQK
ARTSIRASL
HRVTYVPLL
LRSHYREVL
MRPLFLELL
HRAWRTFVL
MRRKLFGVL
LRLVDDFLL
LRRVGDDVL
YRKSVWSKL
QRLCERGAK
FRALVAQCL
SRKLPGTTL
LRRLVPPGL
RRSPGVGCV
RRVGDDVLV
VRGCAWLRR
VRSLLRSHY
ARTFRREKR
SRSLPLPKR

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(34)

表 2 (續)

LREEILAKF
IRRDGLLLR
QRGDPAAFR
LRPIVNMDY

ARRLVETIF
ARPALLTSR
LRPSLTGAR
LRLKCHSLF
FRREKRAER
ARGGPPEAF
CRAVRSLLR
GRTRGPSDR
RRRLGCERA
LRELSEAEV
ARCALFVLV

RPAEEATSL
DPRRLVQLL
RPSFLLSSL
LPSEAVQWL
RPALLTSRL
LPSDFKITL
RPPPAAPSF
LPRLPQRYW
LPNTVTDAL
LPGTTLTAL
LAKFLHWLM
KAKNAGMSL
GSRHNERRF
KALFSVLNY
SPLRDAVVI
RAQDPPPEL
MPAHGLFPW

AEVRQHREA
REAGVPLGL
EEATSLEGA
LEAAANPAL
QETSPLRDA
REVLPLATF

五、發明說明 (35)

表 2 (續)

KEQLRPSFL
REKPQGSVA
LEVQSDYSS
REARPALLT
EEDTDPRRL
REEILAKFL
CERGAKNVL
DDVLVHLLA
GDMENKLFA
YERARRPGL

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(36)

序列鑑識明細

序列明細所有序列之共通性

序列類型：肽類

序列單位：胺基酸

拓撲學：線狀

序列鑑識編號：1

序列長度：22 胺基酸

FLHWLMSVYVVELLRSFFYVTE

1 5 10 15 20

序列鑑識編號：2

序列長度：16 胺基酸

EARPALLTSRLRFIPK

1 5 10 15

序列鑑識編號：3

序列長度：16 胺基酸

DGLRPIVNMDYVVGAR

1 5 10 15

序列鑑識編號：4

序列長度：18 胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (3)

GVPEYGCVVNLRKTVVNF

1 5 10 15

序列鑑識編號：5

序列長度：23 胺基酸

KFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTE

1 5 10 15 20

序列鑑識編號：6

序列長度：17 胺基酸

KFLHWLMSVYVVELLRS

1 5 10 15

序列鑑識編號：7

序列長度：18 胺基酸

LMSVYVVELLRSFFYVTE

1 5 10 15

序列鑑識編號：9

序列長度：9 胺基酸

ILAKFLHWL

1 5

序列鑑識編號：10

五、發明說明 (38)

序列長度：9 胺基酸

ELLRSFFYV

1 5

序列鑑識編號：11

序列長度：9 胺基酸

MSVYVVEL

1 5

序列鑑識編號：12

序列長度：9 胺基酸

TSRLRFIPK

1 5

序列鑑識編號：13

序列長度：9 胺基酸

LTSRLRFIP

1 5

序列鑑識編號：14

序列長度：9 胺基酸

LLTSRLRFI

1 5

五、發明說明(19)

序列鑑識編號：15

序列長度：9 胺基酸

ALLTSRLRF

1 5

序列鑑識編號：16

序列長度：9 胺基酸

PALLTSRLR

1 5

序列鑑識編號：17

序列長度：9 胺基酸

RPALLTSRL

1 5

序列鑑識編號：18

序列長度：9 胺基酸

ARPALLTSR

1 5

序列鑑識編號：19

序列長度：9 胺基酸

EARPALLTS

1 5

六、申請專利範圍

1.一種肽作為製造治療或預防癌症之醫藥品之用途，該肽包括序列 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），該治療或預防包括產生一 T 細胞反應，該 T 細胞反應可對抗之肽為 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），或上述肽經抗原呈現細胞處理後所得至少 8 個胺基酸長的片段。

2.一種核酸作為製造治療或預防癌症之醫藥品之用途，該核酸能編碼之肽包括序列 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），該治療或預防包括產生一 T 細胞反應，該 T 細胞反應可對抗之肽為 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），或上述肽經抗原呈現細胞處理後所得至少 8 個胺基酸長的片段。

六、申請專利範圍

3.根據申請專利範圍第 1 或 2 項之用途，其中該治療或預防包含對罹患或可能罹患癌症之哺乳動物，施用治療上有效量之該肽，俾於該哺乳動物中誘導對抗該端粒酶之 T 細胞反應。

4.根據申請專利範圍第 1 或 2 項之用途，其中該所誘發導之 T 細胞反應為細胞毒殺性 T 細胞反應。

5.根據申請專利範圍第 1 或 2 項之用途，其中該醫藥品為一包含該核酸或肽以及醫藥上可接受之載體或稀釋劑之醫藥組合物。

6.根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該治療或預防包含將至少一包含序列 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10）之肽，與醫藥上可接受之載體或稀釋劑進行混合。

7.根據申請專利範圍第 2 項之用途，其中該治療或預防包含將至少一可編碼包含序列 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10）之肽之核酸，與醫藥上可接受之載體或稀釋劑進行混合。

8.根據申請專利範圍第 1 或 2 項之用途，其中該醫藥

六、申請專利範圍

品含有包括序列 EARPALLTSRLRFIPK (序列鑑識編號 2)，DGLRPIVNMDYVVGAR (序列鑑識編號 3)，GVPEYGCVVNLRKTVVNF (序列鑑識編號 4)，ILAKFLHWL (序列鑑識編號 9) 或 ELLRSFFYV (序列鑑識編號 10) 之肽，及至少一種能夠誘導對抗致癌基因或突變型腫瘤抑制蛋白質或肽之 T 細胞反應的肽，及醫藥上可接受之載體或稀釋劑。

9. 根據申請專利範圍第 8 項之用途，其中該治療或預防包含將包括序列 EARPALLTSRLRFIPK (序列鑑識編號 2)，DGLRPIVNMDYVVGAR (序列鑑識編號 3)，GVPEYGCVVNLRKTVVNF (序列鑑識編號 4)，ILAKFLHWL (序列鑑識編號 9) 或 ELLRSFFYV (序列鑑識編號 10) 之肽，及至少一種能夠誘導對抗致癌基因或突變型腫瘤抑制蛋白質或肽之 T 細胞反應的肽，及醫藥上可接受之載體或稀釋劑進行混合。

10. 根據申請專利範圍第 8 項之用途，其中該致癌基因蛋白質或肽類為突變型 p21-ras 蛋白質或肽；或其中該腫瘤抑制蛋白質或肽類為成視網膜細胞瘤或 p53 蛋白質或肽。

11. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之用途，其中該癌症細選自包括下列之群組：乳癌、前列腺癌、胰臟癌、結腸直腸癌、肺癌、惡性黑素癌、白血症、淋巴瘤、卵巢癌、腦癌及膽管癌。

12. 一種產生能夠辨識且破壞哺乳動物腫瘤細胞之 T 淋

六、申請專利範圍

巴的方法，其包含於其量足以產生端粒酶特異性 T 淋巴細胞之一肽的存在下，培養來自哺乳動物採集 T 淋巴細胞樣本，其中該肽包括序列 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），其中該端粒酶特異性 T 淋巴細胞產生的反應可對抗之肽為 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），或上述肽經抗原呈現細胞處理後所得至少 8 個胺基酸長的片段。

13.一種端粒酶特異性 T 淋巴細胞，其係經由根據申請專利範圍第 12 項之方法產生。

14.一種組合作為製造治療或預防癌症之醫藥品之用途，其中該組合為端粒酶肽及能夠誘導對抗致癌基因或突變型腫瘤抑制蛋白質或肽之 T 細胞反應的肽，該端粒酶肽包括序列 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），且該治療或預防包括產生一 T 細胞反應，該 T 細胞反應可對抗之肽為 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2）。

六、申請專利範圍

識編號 2)，DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10），或上述肽經抗原呈現細胞處理後所得至少 8 個胺基酸長的片段。

15. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之用途，申請專利範圍第 12 項之方法或申請專利範圍第 13 項之 T 淋巴細胞，其中包括序列 EARPALLTSRLRFIPK（序列鑑識編號 2），DGLRPIVNMDYVVGAR（序列鑑識編號 3），GVPEYGCVVNLRKTVVNF（序列鑑識編號 4），ILAKFLHWL（序列鑑識編號 9）或 ELLRSFFYV（序列鑑識編號 10）之肽係含有 9 至 25 個胺基酸。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線